

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-91325

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月22日

A 61 K 37/02  
9/58  
47/00

3 3 4

8615-4C  
G-6742-4C  
C-6742-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⑯ 発明の名称 顆粒球コロニー刺激因子を含有する徐放性製剤

⑰ 特 願 昭61-237027

⑱ 出 願 昭61(1986)10月7日

⑲ 発 明 者 町 田 実 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内  
⑳ 発 明 者 荒 川 正 幸 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内  
㉑ 出 願 人 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号  
㉒ 代 理 人 弁理士 野崎 眞也

#### 明 細 書

##### 1. 発明の名称

顆粒球コロニー刺激因子を含有する徐放性製剤

##### 2. 特許請求の範囲

1 顆粒球コロニー刺激因子を有効成分として、生体内分解性膜能を有する生体内組織適合性高分子からなる基剤に包含せしめてなる徐放性製剤。

2 基剤がポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸およびこれらの共重合体(分子量約1,000~25,000)の中から選ばれたものである特許請求の範囲第1項記載の徐放性製剤。

3 顆粒球コロニー刺激因子を有効成分として、生体内分解性膜能を有する生体内組織適合性高分子からなる基剤に包含せしめると共にコラーゲン、ゼラチン、キトリン又はその誘導体、キチン又はその誘導体、ヒアルロン酸又はその塩、アルギン酸又はその塩、ヒト血清アルブミンから選ばれる1又は2以上を含有する徐放性製剤。

4 基剤がポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸およびこれらの共重合体(分子量

約1,000~25,000)の中から選ばれたものである特許請求の範囲第3項記載の徐放性製剤。

##### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子(以下G-CSFと略す)を有効成分として安定に含有する新規な徐放性製剤に関する。

(従来の技術)

コロニー刺激因子(CSF)に関してはすでに、種々の研究が行われており、ヒト由来のCSFについても、Stanley等フェデレーション プロシーディング(Fed.Proc.) 34 2272 (1975)、及び Burgiss等ブラッド(Blood) 49 573 (1977)など多くの報告がなされている。

しかし、G-CSFについては完全に純化されたものはなく、純粋で均質なG-CSFの大量取得法も確立していなかった。

このような状況を打破すべく本出願人は研究を重ね、目的とする純粋で大量均一なG-CSFの取得に成功し先に特願昭59-153273号、

特願昭60-289455号、特願昭60-269456号、特願昭60-270838号、特願昭60-270839号、特願昭61-166710号参照)。

そこでこの成果をふまえ、種々の難病に対し、G-CSFを利用した治療法の検討を続けた結果、これまでに骨髓移植後の造血機能回復促進剤、薬剤起因性や他の原因によってひき起こされる白血球減少症の治療剤、骨髄性白血病の治療剤、或いは近年問題になっている日和見感染等の感染症に有効な感染防禦剤などの開発に成功した(特願昭61-10280号、特願昭61-10281号、特願昭61-75550号、特願昭61-125660号参照)。

(発明が解決しようとする問題点)

しかし、G-CSFを有効成分とする薬剤も治療効果をより確実なものとするためには投与方法をさらに工夫しなければならないという問題があった。

すなわち、本出願人の研究によりG-CSFの投与量は通常成人一人当たり0.1 ~ 500 $\mu$ g、好ましくは0.5 ~ 200 $\mu$ gであることが判明している

が、このように投与量が微量であって、しかも、この種の糖タンパク質の薬剤が内包している次の問題点を有していることが明らかになったからである。

すなわち、ペプチド類は生体透過性がとぼしく、とりわけ分子量が大きいとその傾向も助長されるので、これを克服しようとして、一般には皮下投与する方法が用いられている。しかし皮下投与をしても、皮下組織に存在する蛋白分解酵素により分解されるか、又は投与部位での重合もしくは会合することにより不活性化されてしまう恐れがあり、その結果期待し得る薬理効果とその持続性が十分に得られないという問題点がある。

(問題点を解決するための手段)

本発明者はこのような問題を解決すべく検討を重ねた結果、G-CSF含有製剤を生体内分解性機能を有する生体内組織適合性高分子物質の基剤からなる徐放性製剤にし、これを皮下又は筋肉内に投与することによってその問題を解決できることを見出し本発明に到達した。

すなわち本発明は、顆粒球コロニー刺激因子を有効成分として含有する徐放性製剤を提供するものである。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明の徐放性製剤の有効成分であるG-CSFは特にその由来が制限されるものではなく、例えば人の生体試料から抽出、分離、精製したもの、G-CSF産生細胞を培養し、その培養上清から単離したもの、細胞融合法を用いてG-CSF産生ハイブリドーマを形成しこれから取得したもの、遺伝子組換えによって、大腸菌、動物細胞等の宿主を形質転換して得た形質転換体から産生せしめ単離精製したもの、又はそれを化学修飾したもの等のいずれも使用することができる。

しかし、それらの中でも純度よく均質大量に入手できる本出願人が製造した次の(1)又は(2)で示すヒトG-CSFが特に好ましいものである。

(1) 次の理化学的性質を有するヒトG-CSF。

①分子量：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定で

約19,000 $\pm$ 1,000。

②等電点：pI=5.5 $\pm$ 0.1、pI=5.8 $\pm$ 0.1、pI=6.1 $\pm$ 0.1の三つの等電点のうち少なくとも1つを有する。

③紫外部吸収：280nmに極大吸収を有し、250nmに極小値をもつ。

④N末端から21残基目迄のアミノ酸配列が次の如くである。

H<sub>2</sub>N-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu-Glu-Gln-Val-

(2) 下記のアミノ酸配列またはその一部で表わされるヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド又はこれと糖鎖部を有する糖蛋白質を含有するヒトG-CSF。

(Het)<sub>n</sub> Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu)<sub>m</sub> Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro

Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu  
Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu  
Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu  
Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp  
Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr  
Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met  
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met  
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala  
Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser  
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His  
Leu Ala Gln Pro (但しn は0又は1を表わし、  
n は0又は1を表わす)。

上記のヒトG-CSFは例えば後述する参考例  
に示す方法によって製造することができる。即ち、  
上記(1)のヒトG-CSFは参考例1によって、  
又(2)のヒトG-CSFは参考例2に示す方法に  
より得ることができる。

なおこれらの方法の詳細な製造条件については、  
本出願人が先に出願した特願昭59-153273号、特  
願昭60-269455号、特願昭60-269456号、特願昭

60-270838号、特願昭60-270839号、特願昭61-  
166710号の各明細書を参照されたい。

G-CSFの投与量は、その対象となる疾患及  
び患者の病状にあわせて決めることができるが、  
通常成人一人当たり 0.1~500 $\mu$ g、好ましくは  
0.5 $\mu$ g~200 $\mu$ gのG-CSFを含有する徐放  
性製剤を投与することができる。しかし、本発明  
はG-CSFの当該含有量によって限定されるも  
のではない。

次に本発明の徐放性製剤を構成する基剤は1回  
の投与で一定の血中濃度を維持し、長時間にわた  
って、安定に効力を発揮せしめる機能を付与する  
ものでなければならない。

本発明の徐放性製剤は、上述のような機能を有  
する基剤として生体内分解性機能を有する生体内  
組織適合性高分子物質を用い、これにG-CSF  
が含まれるように構成せしめたものであり、更  
にはコラーゲン、ゼラチン、キトリン又はその誘  
導体、キチン又はその誘導体、ヒアルロン酸又は  
その塩、アルギン酸又はその塩、ヒト血清アルブ

ミンから選ばれる1又は2以上を含有せしめてな  
ることを特徴とするものである。

上記基剤としては、ポリ乳酸、ポリグリコール  
酸、ポリヒドロキシ酪酸等およびこれらの共重合  
体(分子量約1,000~25,000)が挙げられる。

本発明の徐放性製剤は、例えば以下のような方  
法によって製造される。

① 上記の如き基剤を適当な溶媒に溶解したも  
のにG-CSFの凍結乾燥粉末を加えて攪拌混合  
する。次に、この混合溶液を製剤用成型器中で、  
減圧あるいは凍結乾燥等により膜溶解し、固化さ  
せるか又は更に圧縮成型する(実施例1)。

② 上記基剤を適当な溶媒に溶解したものにG  
-CSFの凍結乾燥粉末を加えて攪拌混合する。  
次にこれをコラーゲン、ゼラチン、キトリン又は  
その誘導体、キチン又はその誘導体、ヒアルロン  
酸又はその塩、アルギン酸又はその塩、ヒト血清  
アルブミン等の中から選ばれる1または2以上か  
らなる分散安定化剤溶液に攪拌下少量ずつ加えて  
乳化せしめマイクロカプセル化させる。この方法

によれば、均一でしかも微細な粒径を持つカプ  
セル製剤を得ることができる。得られた製剤中には、  
上記分散安定化剤溶液中の成分が含有される(実  
施例2~8)。

なお、本発明の徐放性製剤を製造する際用いる  
溶媒としては、蒸留水、各低級液更には、酢酸メ  
チル、酢酸エチル、メチルアルコール、エチルア  
ルコール、n-ブチルアルコール、イソブチルア  
ルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピル  
アルコール、アセトン、アセトンとメチルアルコ  
ール、アセトンとエチルアルコール、アセトンと  
n-ブチルアルコール、アセトンとイソブチルア  
ルコール、アセトンとn-プロピルアルコール、  
アセトンとイソプロピルアルコール、塩化メチ  
レン、塩化メチレンとメチルアルコール、塩化メ  
チレンとエチルアルコール、塩化メチレンとn-ブ  
チルアルコール、塩化メチレンとイソブチルアル  
コール、塩化メチレンとn-プロピルアルコール、  
塩化メチレンとイソプロピルアルコール等を挙げ  
ることができる。

製造工程中の温度はG-CSFが失活しない温度である50℃以下、好ましくは40℃以下とすることが好ましい。

また製造工程は全て無菌的に実施される必要がある。

本発明の徐放性製剤には製薬上許容される分散剤、防腐剤、助溶剤等を適宜添加することができる。又、上述した製造工程で使用する溶媒の徐放性製剤中への残存量は0.1ppm以下が好ましい。

本発明の生体内分解性機能を有する生体内組織適合性高分子物質からなる徐放性製剤の投与は、治療目的に応じて、方法は変化するが皮下もしくは筋肉内への注射によって実施される。

注射の際、G-CSFを含んだ徐放性高分子製剤を注射用溶媒に懸濁した懸濁型注射剤を用いるか、又は注射用溶媒を添付して使用時に調製して用いる方法により、行うことができる。

ここで使用する注射用溶媒としては、生理食塩水、注射用蒸留水、或いは、粘性を有する注射用

液乾燥し、針状の徐放性製剤を得た。

以上の操作工程はすべて無菌に行った。

#### 実施例2

Ⅱ-ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体(75:25)(分子量約2,000)を塩化メチレン:n-プロピルアルコール(4:1)200mlに溶解し、5%の溶液を調製した。これにG-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置で1,000rpmで攪拌混合し、混合溶液とした。

別に40℃に加温しておいた1%ゼラチン水溶液に上記混合溶液を500rpmの速度で攪拌しながら少量ずつ加え乳化させG-CSFを含有するマイクロスフィアを生成せしめた。次いでこのマイクロスフィアを遠心分離で集め、予め40℃に加温してある蒸留水で5回繰返し洗浄し、室温で減圧乾燥した。

得られたG-CSF含有マイクロスフィアは100μm以下の粒径を持つ白色粉末であった。本実施例も実施例1と同様に無菌的に実施した。

溶媒である大豆油、オリーブ油、綿実油、ゴマ油、ヨウ素化ケシ油脂肪酸エチルエステルのような植物油又は中性脂肪酸トリグリセライド、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等が用いられる。

#### (実施例)

以下実施例、実験例で本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

#### 実施例1

Ⅱ-ポリ乳酸10gを塩化メチレン200mlに溶解し、5%溶液とした。

これにG-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置を用いて1,000rpmの速度で攪拌混合し、G-CSF・Ⅱ-ポリ乳酸完全混合溶液にした。

次にこの溶液をテフロン製フィルターでろ過後、テフロン製成形器中に均一に流し込み、これを乾燥機にいれ37℃、窒素ガス気流下、常圧で静置し乾燥した。

続いて、温度を40℃まで上昇させ、減圧下4時

#### 実施例3

Ⅱ-ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体(75:25)(分子量約2,000)を塩化メチレン:n-プロピルアルコール(4:1)200mlに溶解し、5%の溶液を調製した。これにG-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置で1,000rpmで攪拌混合し、混合溶液とした。

別に40℃に加温しておいた1%ヒアルロン酸含有水溶液に上記混合溶液を500rpmの速度で攪拌しながら少量ずつ加え乳化させG-CSFを含有するマイクロスフィアを生成せしめた。以下実施例2と同様にしてG-CSF含有マイクロスフィアを得た。

#### 実施例4

Ⅱ-ポリ乳酸・ポリヒドロキシ酪酸共重合体(90:10)(分子量約2,000)をアセトン:エチルアルコール(1:1)200mlに溶解し、5%の溶液を調製した。これにG-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置で1,000rpmで攪拌混合し、混合溶液とした。

別に40℃に加温しておいた0.2%キチン水溶液に上記混合溶液を500rpmの速度で攪拌しながら少量ずつ加え乳化させG-CSFを含有するマイクロソフィアを生成せしめた。以下実施例2と同様にしてG-CSF含有マイクロソフィアを得た。

#### 実施例5

Ⅰ-ポリ乳酸・ポリヒドロキシ酪酸共重合体(90:10)(分子量約2,000)をn-プロピルアルコール200mlに溶解し、5%の溶液を調製した。これにG-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置で1,000rpmで攪拌混合し、混合溶液とした。

別に40℃に加温しておいた1%アルギン酸水溶液に上記混合溶液を500rpmの速度で攪拌しながら少量ずつ加え乳化させG-CSFを含有するマイクロソフィアを生成せしめた。以下実施例2と同様にしてG-CSF含有マイクロソフィアを得た。

#### 実施例6

ポリグリコール酸・ポリヒドロキシ酪酸共重合体(50:50)(分子量約2,000)を塩化メチレン200mlに溶解し、5%の溶液を調製した。これに

G-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置で1,000rpmで攪拌混合し、混合溶液とした。

別に40℃に加温しておいた0.5%キトサン酸水溶液に上記混合溶液を500rpmの速度で攪拌しながら少量ずつ加え乳化させG-CSFを含有するマイクロソフィアを生成せしめた。以下実施例2と同様にしてG-CSF含有マイクロソフィアを得た。

#### 実施例7

ポリグリコール酸・ポリヒドロキシ酪酸共重合体(25:75)(分子量約2,000)をアセトン:塩化メチレン(1:4)200mlに溶解し、5%の溶液を調製した。これにG-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置で1,000rpmで攪拌混合し、混合溶液とした。

別に40℃に加温しておいた1%コラーゲン水溶液に上記混合溶液を500rpmの速度で攪拌しながら少量ずつ加え乳化させG-CSFを含有するマイクロソフィアを生成せしめた。以下実施例2と同様にしてG-CSF含有マイクロソフィアを得た。

#### 実施例8

Ⅰ-ポリ乳酸10gをアセトン200mlに溶解し、5%の溶液を調製した。これにG-CSF凍結乾燥粉末2.5mgを加え、攪拌装置で1,000rpmで攪拌混合し、混合溶液とした。

別に40℃に加温しておいた2%ヒト血清アルブミン水溶液に上記混合溶液を500rpmの速度で攪拌しながら少量ずつ加え乳化させG-CSFを含有するマイクロソフィアを生成せしめた。以下実施例2と同様にしてG-CSF含有マイクロソフィアを得た。

#### 実験例1

前記実施例1~8で得たG-CSF含有徐放性製剤の効果はWistar-Imamichi系統性ラットの13週齢のものを用いて実験検討した。

実験は、午前9時にコントロールの採血を行った後、生理食塩水あるいはコントロールG-CSF水溶液あるいは徐放性製剤を投与した。投与量ならびに投与経路は生理食塩水については0.5ml、またコントロールのG-CSF水溶液(ラット血

清アルブミン0.5%、マンニトール1%生理食塩水を含む)は、G-CSFとして2.5μg/0.5ml/Ratを、更に8種のG-CSF含有徐放性製剤は、針状(実施例1)でG-CSFを10μg含有するもの及び懸濁液の剤形(実施例2~8)で、G-CSFとして10μg/0.5mlをそれぞれラット首背部皮下に投与した。尚、ヒアルロン酸を含有するⅠ-ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体(75:25)の懸濁剤(実施例3)については、筋肉内にも投与した。

投与は、生理食塩水ならびにコントロールのG-CSF水溶液については1日1回を2週間行い、G-CSF含有徐放性製剤は、1回投与後2週間の間隔を観察した。

評価はG-CSF水溶液をコントロールに、ラット末梢好中球数の変動により行った。具体的には、投与後、ラットの背中足静脈への穿刺により採血した血液をマイクロセルカウンター(トーアCC170型)により赤血球、白血球、ヘモグロビン量を測定するとともに塗抹標本を作製しヘモグラ

ムを求め、その白血球数との積より好中球数を算出した。

その結果、図1-1(実施例1~3の除放射性製剤を用いた実験)、図1-2(実施例4~8の除放射性製剤を用いた実験)に示すようにG-CSF水溶液単回投与(1日/1回 2.5 $\mu$ g/Rat)に比較して、本発明のG-CSF含有除放射性製剤(針状及び懸濁液)投与では、いずれの投与後日数においてもコントロールと同程度もしくはそれ以上の末梢好中球数の増加を確認した。

また、前述した製造例②により得られる本発明の除放射性製剤(実施例2~8)は、いずれも末梢好中球数の増加傾向が更に大であることが認められた。これは、製造例②において用いた分散安定化剤の成分が製造工程中で製剤中に包含され、その結果均一で微細な粒径を持つ除放射性製剤が得られ、そのような製剤が製剤中のG-CSFの生体内への放出をよりスムーズにしたためと考えられる。

更に、図2に示すように、本発明の除放射性製剤

はG-CSFの単回投与(1日/1回 2.5 $\mu$ g/Rat)に比較し、末梢好中球の日内変動が少ないことも確認された。

以上の結果は本発明の如き生体内分解性機能を有する生体内組織適合性高分子物質からなる基剤にG-CSFを包含せしめてなる除放射性製剤は、通常の注射剤で懸念される投与後の酵素による加水分解あるいは重合等を防ぎしかも少ない投与量でコントロールと同様又はそれ以上の効果を示す等有用性の高いことを示す。

更に、本発明の製剤を投与した場合、単回投与に比較して日内の末梢好中球の変動は極めて少なく抑えられ(図2/、投与後1日目2日目に1日2回測定した末梢好中球の変動の比較の結果)、このことから種々の適応疾患に対しその症状に応じた投与計画の立案が可能となり、G-CSFを用いた治療に一助貢献し得ることを示唆した。なお、本発明における除放射性製剤技術は顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)やマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)

の除放射性製剤の製造にも適用可能である。

#### 参考例1 (G-CSF産生細胞の培養によるヒトG-CSFの製造例)

特開昭59-153273号の実施例1に示す方法で樹立したヒト口腔癌細胞由来のG-CSF産生細胞株CHU-1(C.N.C.H 受託番号「I-315」)または同様の方法で樹立した細胞株CHU-2(C.N.C.H 受託番号「I-483」)をウシ胎児血清を含有するRPMI 1640培養液に浮遊した後、ローラーボトルにいて回転培養を行った。細胞がローラーボトル内壁に密に増殖したところで培養液を血清不含RPMI 1640にかえ、4日間培養後上清を回収。次いで血清含有RPMI 1640を加えて3日間培養した後、培養液を血清不含RPMI 1640に液替し、4日間培養後上清を回収する。以下これを繰返し培養上清を回収した。得られた血清不含培養上清を限外ろ過で約1000倍に濃縮し精製、次いで検定を行った。

精製及び検定は前記特開昭59-153273号明細書

の実施例と同じ方法で行った。

#### 参考例2

(遺伝子組換えによるヒトG-CSFの製造例)

本出願人によって微工研に寄託されているエシエリヒア・コリ(E. Coli) x1776R-2株(FERM BP-955)から切り出してきたヒトG-CSF遺伝子を有するcDNA断片をベクターpdkCRに組み込みpHQV2プラスミドとした後これをSalIで処理し、次いでDNAポリメラーゼ-Klenow断片を反応させる。

このDNAにEcoRIリンカーを付加し、再びEcoRIで部分消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約2.7Kbのフラグメントを回収する。

一方、pAdD26SVpAプラスミド(Kaufman, R. G. & Sharp, P. A. (1982) Mol. Cell. Biol. 2巻1304~1319)をEcoRIで処理し、BAP処理し、脱リン酸する。次でフェノール処理後電気泳動でpAdD26SVpAのEcoRI断片を回収した。

上記の2.7kb断片とpAdD26SVpA断片

をアニールし、E. coli DH1株に塩化ルビウム法により形質転換してpHGV2-dhfrプラスミドを得た。

つぎにCHO細胞(dhfr<sup>-</sup>株、コロンビア大学Dr. L. Chasinより入手)を9cm径のプレート(Nunc社製)中10%仔牛血清を含むα最小必須培地(α-MEM、アデノシン、デオキシアデノシン、チミジン添加)で培養増殖し、これをリン酸-カルシウム法(Wigler等、Cell 14巻725頁(1978))によって形質転換した。

即ち、前記のpHGV2-dhfrプラスミド1μgにキャリア-DNA(子牛胸腺DNA)を適量加えて、TE溶液375μlに溶解し1M CaCl<sub>2</sub> 125μlを加える。3~5分氷上で冷やし500μlの2×HBS(50 mM Hepes、280 mM NaCl、1.5 mM リン酸緩衝液)を加え再び氷冷後、上記のCHO細胞培養液1mlと混合し、プレートに移し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で9時間培養する。以下洗浄、20%グリセロール含有TBS(Tris

-buffered saline)添加、再び洗浄した後非選択培地(前出α-MEM培地、ヌクレオシド添加)を添加して2日間インキュベートし、選択培地で1:10に細胞を分割した。次いで2日毎に選択培地(ヌクレオシド無添加)にて培地交換を行いながら培養を続行し生じた集塊(foci)を選別して新しいプレートに移した。

新しいプレートでは0.02μMメトトレキサート(MTX)存在下で増殖し再び0.1μM MTX存在下で増殖させてクローニングを行った。

更にクローニングを続けた結果10<sup>4</sup>個/皿以上のヒトG-CSFの生産を確認した。

なお、精製、検定は特願昭60-269456号明細書の実施例2及び15の記載の方法によって行った。

#### (発明の効果)

本発明のG-CSFを有効成分とする徐放性製剤は、通常の注射剤で問題となる投与後の肝臓による加水分解又は重合等の心配もなく、また、1回の投与によって長時間の効果を維持(図1-1)及び1-2)参照)することを可能にし、更に単回

投与に比べ日内の末梢好中球の変動が少ない(図2参照)という優れた効果を有している。

したがって本発明の徐放性製剤を用いることにより種々のG-CSF適応疾患に対し、その症状に応じた投与計画が立てられ、G-CSFを用いた治療に大きく貢献することが期待される。

#### 4. 図面の簡単な説明

図1-1)及び図1-2)は本発明のG-CSF含有徐放性製剤(実施例1~8)とコントロールのG-CSF水溶液をラット首背部に皮下及び大腿部筋肉内投与後の末梢好中球数の変動を示したグラフである。

図2は、本発明のG-CSF含有徐放性製剤(実施例1及び2)とコントロールのG-CSF水溶液をラット首背部に皮下投与し、投与後2日目までの末梢好中球数の変動を比較したグラフである。

特許出願人 中外製薬株式会社  
代理人 弁理士 野崎 誠也

図1-1)

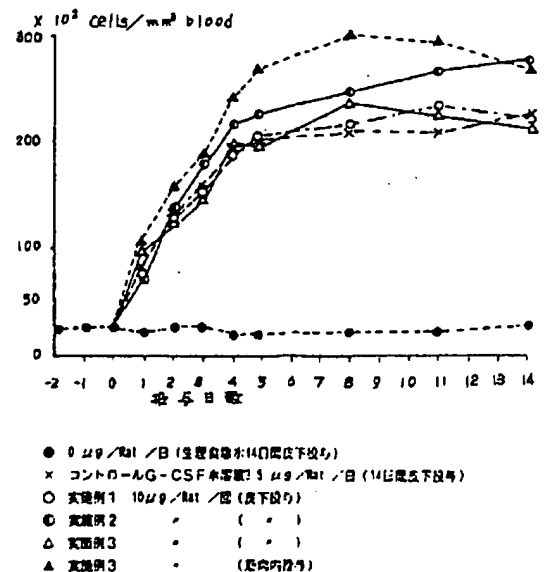


図 1 - 2)

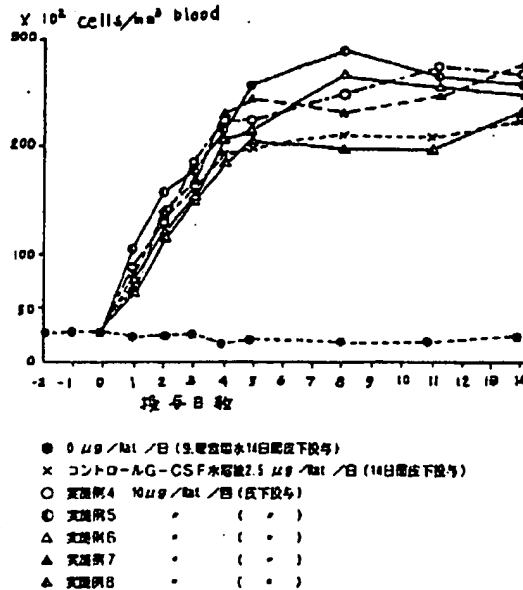
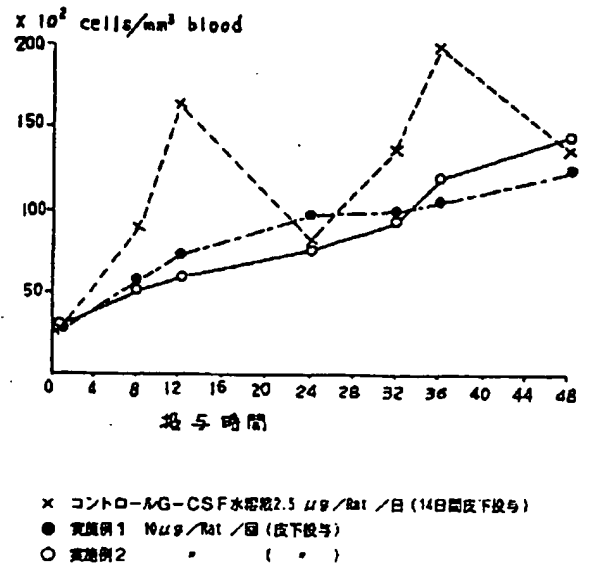


図 2



## 手続補正書 (自発)

昭和61年12月26日

特許庁長官 黒田明雄 殿

## 1. 事件の表示

昭和61年特許願第237027号

## 2. 発明の名称

顆粒球コロニー刺激因子を含有する徐放性製剤

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

東京都北区浮間5丁目5番1号

(331) 中外製薬株式会社

代表者 上野公夫

## 4. 代理人 郵便番号104

東京都中央区築地2丁目15番15号

セントラル東銀座802号室

電話 東京545-4570

(7549) 弁理士 野崎 純也

## 5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

## 6. 補正の内容

1 明細書第5頁第13行の「単離精製したもの、」と「又は」の間に次の文章を挿入する。

「(この中には、インターフェロン遺伝子で知られているような多形現象 (polymorphism (例えば Nishi等:ジャーナル オブ バイオケミストリー/J. Biochem /97巻 153~159 頁1985年を参照))によって生ずるヒトG-CSF、例えば後記アミノ酸配列中の1個またはそれ以上のアミノ酸を欠いたポリペプチド、あるいは1個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでヒトG-CSF活性を有するもの、を含む)」